蛋氨酸缺乏对蛋鸡产蛋后期生产性能、血清游离氨基酸含量和肝脏蛋氨酸代谢相关基因表达的影响

刘怡琳[1]　吴　信[2]　印遇龙[1,2]　王占彬[1*]

（1.河南科技大学动物科技学院，河南省饲草饲料资源开发与畜禽健康养殖院士工作站，洛阳 471003；2.中国科学院亚热带农业生态研究所，中国科学院亚热带农业生态过程重点实验室，湖南省畜禽健康养殖工程技术研究中心，长沙 410125）

摘　要：本试验旨在研究蛋氨酸缺乏对蛋鸡产蛋后期生产性能、血清游离氨基酸含量和肝脏蛋氨酸代谢相关酶基因表达的影响。选取 180 只 62 周龄的海兰灰蛋鸡，根据产蛋率均匀分成 3 组（每组 6 个重复，每个重复 10 只）：对照组饲喂蛋氨酸水平为 0.33%的饲粮，蛋氨酸缺乏组分别饲喂蛋氨酸水平为 0.21%和 0.27%的饲粮，试验期 90 d。结果表明：1）饲粮蛋氨酸缺乏显著降低了蛋鸡的平均日采食量、产蛋率、平均日产蛋重、平均蛋重和不合格蛋率（$P<0.05$），显著提高了料蛋比（$P<0.05$）。2）蛋氨酸缺乏显著降低蛋鸡血清中蛋氨酸的含量（$P<0.05$）。0.21%蛋氨酸组蛋鸡血清中丝氨酸、甘氨酸和丙氨酸的含量显著高于其他 2 组（$P<0.05$）。0.27%蛋氨酸组蛋鸡血清中缬氨酸、异亮氨酸和精氨酸的含量显著低于对照组（$P<0.05$），脯氨酸的含量显著低于 0.21%蛋氨酸组（$P<0.05$）。3）与对照组相比，0.21%蛋氨酸组蛋鸡肝脏中 DNA 甲基转移酶 1、N^6–甲基腺苷（m^6A）甲基转移酶 3（*METTL3*）和 m^6A 甲基转移酶 14 的表达量显著提高（$P<0.05$），0.27%蛋氨酸组蛋鸡肝脏中 *METTL3* 的表达量显著提高（$P<0.05$）。4）与对照组相比，0.21%蛋氨酸组蛋鸡肝脏中甲硫氨酸腺苷转移酶 1a、5–甲基四氢叶酸–同型半胱氨酸甲基转移酶（*MTR*）和胱硫醚–β–合成酶的表达量显著提高（$P<0.05$），0.27%蛋氨酸组蛋鸡肝脏中 *MTR* 的表达量显著提高（$P<0.05$）。蛋氨酸缺乏对蛋鸡肝脏甲硫氨酸腺苷高半胱氨酸酶和甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶的表达量无显著影响（$P>0.05$）。由以上结果可知：蛋鸡饲粮高水平的蛋氨酸缺乏会降低蛋鸡的生产性能，可能与蛋氨酸缺乏改变蛋氨酸代谢途径，影响 DNA 和 RNA 的甲基化过程有关。

关键词：蛋氨酸；蛋鸡；生产性能；蛋氨酸代谢；甲基化；基因表达

收稿日期：2017–02–13

基金项目：国家重点研发计划（2016YFD0500504）

作者简介：刘怡琳(1992–)，女，河南南阳人，硕士研究生，从事动物营养与饲料科学专业究。

E-mail: 15236286951@163.com

*通信作者：王占彬，教授，硕士生导师，E-mail: wangzhanbin3696@126.com

中图分类号：S831.5　　文献标识码：A　　文章编号：1007-267X（2017）00-0000-00

蛋氨酸是必需氨基酸中唯一的含硫氨基酸，在机体内参与蛋白质合成，是半胱氨酸、还原型谷胱甘肽和牛磺酸合成的前体物，并为肌酸、磷脂酰胆碱和多胺合成等转甲基化反应及DNA、RNA 和组蛋白的甲基化提供甲基[1-2]。机体可通过对蛋氨酸限制的代谢适应提高线粒体的生物合成和功能及能量消耗，改变脂质和碳水化合物稳态，降低氧化损伤和炎症，延长寿命[3]。但是，蛋氨酸是蛋鸡的第一限制性氨基酸，限制其在饲粮中添加量会引起蛋鸡的产蛋率、蛋重、饲料利用率、体重下降以及肝脏脂质聚积[4-5]。这不仅是由于蛋氨酸缺乏影响了氨基酸平衡和蛋白质利用率，还与蛋氨酸代谢过程的改变有关，如甘氨酸、丝氨酸、胆碱、半胱氨酸和谷胱甘肽等代谢中间产物的水平变化[6]。不过，关于蛋氨酸缺乏对蛋氨酸代谢过程的具体影响还未有报道。本研究旨在以海兰灰蛋鸡为试验动物，通过研究饲粮中蛋氨酸缺乏对海兰灰蛋鸡生产性能、血清游离氨基酸含量和蛋氨酸代谢相关酶基因表达的影响，以期为蛋氨酸的科学利用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验设计

试验采用单因子完全随机区组试验设计。选取 180 只 62 周龄的海兰灰蛋鸡，根据产蛋率均匀分成 3 个组，每个组 6 个重复，每个重复 10 只鸡。对照组饲喂蛋氨酸水平为 0.33%的饲粮（基础饲粮），蛋氨酸缺乏组分别饲喂蛋氨酸水平为 0.21%和 0.27%的饲粮。基础饲粮组成及营养水平见表 1。蛋鸡饲养于三阶梯蛋鸡笼中，每笼 2 只鸡，每个重复随机分布在鸡舍，乳头式饮水器。夜间开灯补光，每天总光照时间为 16 h。自由采食和饮水，每天 07:30和 15:30 各补料 1 次。试验期 90 d。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis)　　%

原料 Ingredients	含量 Content	营养水平 Nutrient levels2)	含量 Content
玉米 Corn	63.00	代谢能 ME/(MJ/kg)	11.51
豆粕 Soybean meal	13.00	粗蛋白质 CP	14.50
膨化大豆 Expanded soybean	5.00	钙 Ca	3.81
麸皮 Wheat bran	6.00	总磷 TP	0.58
石粉 Limestone	9.00	有效磷 AP	0.38

磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.50	蛋氨酸 Met	0.21
氯化胆碱 Choline chloride	0.10	蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.47
食盐 NaCl	0.30	赖氨酸 Lys	0.64
预混料 Premix[1)]	0.18		
沸石粉 Zeolite powder	1.92		
合计 Total	100.00		

[1)]预混料为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kg of the diet：VA 12 000 IU，VB_1 3 mg，VB_2 9 mg，VB_6 6 mg，VB_{12} 0.03 mg，VD_3 3 000 IU，VE 30 IU，VK_3 6 mg，泛酸 pantothenate 18 mg，生物素 biotin 0.12 mg，叶酸 folic acid 1.5 mg，烟酰胺 nicotinamide 6 mg，Mn 106 mg，I 0.8 mg，Fe 90 mg，Cu 6.4 mg，Zn 70 mg，Se 0.3 mg。

[2)]营养水平为计算值。Nutrient levels were calculated values.

1.2　试验材料

DL–蛋氨酸(纯度99%)购自法国安迪苏公司。

1.3　检测指标

1.3.1　生产性能

试验期间以重复为单位记录每周采食量、每日产蛋数、破畸数、产蛋重和破畸重等。计算产蛋率、平均日产蛋重、平均日采食量、料蛋比、平均蛋重和不合格蛋率。

1.3.2　血清游离氨基酸含量

于试验第 90 天，每组随机选取 6 只蛋鸡，颈脉采血，3 000 r/min 离心 10 min 制备血清，－20 ℃保存。取 600 μL 血清加入 600 mL 8%的磺基水杨酸漩涡混匀，4 ℃静置过夜，8 000 r/min 离心 10 min，取上清液，用过滤器(孔径 0.22 μm)过滤，取 500 μL 过滤液于氨基酸分析仪进行游离氨基酸含量分析。

1.3.3　蛋氨酸代谢相关酶基因表达量

在蛋鸡放血处死后，迅速剖腹取出肝脏，用液氮速冻并转至－80 ℃的冰箱内保存，用于实时荧光定量 PCR 检测。实时荧光定量 PCR 为 10 μL 体系，包括 1 μL 的 cDNA 模版、5 μL 的 SYBR Green 荧光染料、0.3 μL 的上游引物、0.3 μL 的下游引物和 3.4 μL 的双蒸水。测定的基因包括甲硫氨酸腺苷转移酶 1a（*MAT*1*a*）、DNA 甲基转移酶 1（*Dnmt*1）、DNA 甲基转移酶 3a（*Dnmt*3*a*）、N^6–甲基腺苷（m^6A）甲基转移酶 3（*METTL*3）、m^6A 甲基转移酶 14（*METTL*14）、甲硫氨酸腺苷高半胱氨酸酶（*Ahcy*）、5–甲基四氢叶酸–同型半胱氨酸甲基转

移酶（*MTR*）、甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶（*BHMT*）和胱硫醚–β–合成酶（*CBS*），引物根据鸡的基因序列用 NCBI 设计（表 2）。

表 2　引物序列

Table 2　Primer sequences

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5′—3′)	产物大小 Product size/bp
β–肌动蛋白 β-actin	F:TTACTCGCCTCTGTGAAGGC R:TCCTAGACTGTGGGGGACTG	228
甲硫氨酸腺苷转移酶 1a *MAT*1*a*	F:TCGTCGTGTTCTGGTTCAGG R:GACAATGACTCCAGGCCGAA	151
DNA 甲基转移酶 1 *Dnmt*1	F:CAAGATCGAGACCACCGTCC R:GTCCTTGTCGATCCTGGTGG	250
DNA 甲基转移酶 3a *Dnmt*3*a*	F:AGTTCTCAGTGGTCTGCGTG R:CCACCTTGGAGGTGTCAGTC	192
m^6A 甲基转移酶 3 *METTL*3	F:CTACGAACGCGTGGATGAGA R:AGAGTTCGATCTTCCGCGTG	257
m^6A 甲基转移酶 14 *METTL*14	F:ACCCCAAGGCTGTTTTCCAA R:TCGTCCAAGGCAGAAATGCT	197
甲硫氨酸腺苷高半胱氨酸酶 *Ahcy*	F:GCCCTTTGCCATCATCCTCT R:TACTGGGACATTAGGGGCCA	204
胱硫醚–β–合成酶 *CBS*	F:ACGCATGCTAATCCGAGAGG R:AGTTGGAAGCACAGTCAGGG	277
5–甲基四氢叶酸–同型半胱氨酸甲基转移酶 *MTR*	F:GGCTCTTGGAGATCGACTGG R:CGAGCTTCCACATGGTGAGT	197
甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶 *BHMT*	F:GCCTGAAACAGGGCAAAAGG R:TCCCTGTGAAGCTGACGAAC	172

1.4　数据统计分析

数据以平均值和标准误表示，P<0.05 为差异显著。利用 β–肌动蛋白（β-actin）作为内参

基因，用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。试验数据用统计 SPSS 17.0 进行单因子方差分析(one-way ANOVA)，以 Duncan 氏法进行多重比较检验。

2 结 果

2.1 蛋氨酸缺乏对蛋鸡生产性能的影响

由表 3 可知，饲粮蛋氨酸水平显著影响蛋鸡生产性能的各项指标（P<0.05）。蛋鸡的产蛋率、平均日产蛋重和平均蛋重随饲粮蛋氨酸水平的提高而显著增加（P<0.05）。0.33%蛋氨酸组（对照组）蛋鸡的平均日采食量和不合格蛋率均显著高于 0.21%和 0.27%蛋氨酸组（P<0.05）。0.21%蛋氨酸组蛋鸡的料蛋比显著高于 0.27%和 0.33%蛋氨酸组（P<0.05）。

表 3 蛋氨酸缺乏对蛋鸡生产性能的影响

Table 3 Effects of methionine deficiency on performance of laying hens

项目 Items	饲粮蛋氨酸水平 Dietary methionine level/%			SEM	P 值 P-value
	0.21	0.27	0.33		
平均日采食量 ADFI/(g/d)	96.85[c]	101.30[b]	109.00[a]	1.380	<0.001
产蛋率 Egg-laying rate/%	76.65[c]	81.02[b]	85.02[a]	0.980	<0.001
料蛋比 Feed/egg	2.22[a]	2.09[b]	2.11[b]	0.0195	0.007
平均日产蛋重 Average daily egg production/(g/d)	43.65[c]	48.45[b]	52.03[a]	0.876	<0.001
平均蛋重 Average egg weight/g	56.98[c]	59.85[b]	61.18[a]	0.479	0.033
不合格蛋率 Unqualified rate of eggs/%	0.05[b]	0.10[b]	0.27[a]	0.0376	0.001

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著(P＞0.05)，不同小写字母表示差异显著(P＜0.05)。下表同。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference (P>0.05), while with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05). The same as below.

2.2 蛋氨酸缺乏对蛋鸡血清游离氨基酸含量的影响

由表 4 可知，蛋氨酸缺乏对蛋鸡血清中蛋氨酸的含量有显著的影响，随饲粮蛋氨酸水平的降低而显著降低（$P<0.05$）。0.21%蛋氨酸组蛋鸡血清中丝氨酸、甘氨酸和丙氨酸的含量显著高于其他 2 组（$P<0.05$）。0.27%蛋氨酸组蛋鸡血清中缬氨酸、异亮氨酸和精氨酸的含量显著低于 0.21%和 0.33%蛋氨酸组（$P<0.05$）。0.27%蛋氨酸组蛋鸡血清中脯氨酸的含量显著低于 0.21%蛋氨酸组（$P<0.05$）。

表 4　蛋氨酸缺乏对蛋鸡血清游离氨基酸含量的影响

Table 4　Effect of methionine deficiency on serum free amino acid contents of laying hens　　μg/mL

项目 Items	饲粮蛋氨酸水平 Dietary methionine level/% 0.21	0.27	0.33	SEM	*P* 值 *P*-value
蛋氨酸 Met	8.65^{c}	11.94^{b}	14.80^{a}	0.739	<0.001
半胱氨酸 Cys	6.78	8.50	10.16	0.599	0.060
丝氨酸 Ser	98.41^{a}	71.70^{b}	78.69^{b}	4.101	0.008
甘氨酸 Gly	44.73^{a}	37.20^{b}	39.79^{b}	1.157	0.015
牛磺酸 Tau	45.18	44.43	42.15	2.329	0.873
赖氨酸 Lys	31.32	29.45	33.17	1.653	0.619
苏氨酸 Thr	39.52	34.32	38.42	1.524	0.363
谷氨酸 Glu	27.61	26.09	22.76	1.174	0.236
丙氨酸 Ala	57.78^{a}	42.95^{b}	45.29^{b}	2.519	0.018
缬氨酸 Val	21.30^{a}	17.78^{b}	22.07^{a}	0.717	0.020
异亮氨酸 Ile	11.96^{a}	9.01^{b}	11.48^{a}	0.448	0.004
亮氨酸 Leu	32.43	27.97	30.80	0.977	0.171
酪氨酸 Tyr	33.89	29.54	29.00	1.288	0.247
苯丙氨酸 Phe	17.62	16.38	18.57	0.416	0.092
天冬氨酸 Asp	10.97	9.49	8.72	0.832	0.561
组氨酸 His	27.25	23.54	23.41	0.976	0.195
精氨酸 Arg	67.35^{a}	53.24^{b}	68.70^{a}	2.891	0.042
脯氨酸 Pro	42.66^{a}	32.46^{b}	37.87^{ab}	1.595	0.015

2.3　蛋氨酸缺乏对蛋鸡肝脏蛋氨酸代谢相关基因表达的影响

由表 5 可知，饲粮蛋氨酸水平对 *MAT*1*a*、*Dnmt*1、*METTL*3、*METTL*14、*CBS* 和 *MTR* 在蛋鸡肝脏内的表达量有显著影响（$P<0.05$），但对 *Dnmt*1、*Ahcy* 和 *BHMT* 表达量无显著影响（$P>0.05$）。0.21%蛋氨酸组蛋鸡肝脏中 *Dnmt*1、*METTL*3 和 *METTL*14 的表达量显著高于其他 2 组（$P<0.05$）。0.27%蛋氨酸组蛋鸡肝脏中 *METTL*3 的表达量显著高于对照组（$P<0.05$）。0.21%蛋氨酸组蛋鸡肝脏中 *MAT*1*a* 和 *MTR* 的表达量显著高于其他 2 组（$P<0.05$），*CBS* 的表达量显著高于对照组（$P<0.05$）。0.27%蛋氨酸组蛋鸡肝脏中 *MTR* 的表达量显著高于对照组（$P<0.05$）。

表 5　蛋氨酸缺乏对蛋鸡肝脏蛋氨酸代谢相关基因表达的影响

Table 5　Effects of methionine deficiency on expression of methionine metabolism related genes in laying hens' liver

基因 Genes	饲粮蛋氨酸水平 Dietary methionine level/%			SEM	*P* 值 *P*-value
	0.21%	0.27%	0.33%		
甲硫氨酸腺苷转移酶 1a *MAT*1*a*	1.49^{a}	1.09^{b}	1.00^{b}	0.067	0.001
DNA 甲基转移酶 1 *Dnmt*1	1.61^{a}	0.96^{b}	1.00^{b}	0.094	0.001
DNA 甲基转移酶 3a *Dnmt*3*a*	1.89	1.10	1.00	0.171	0.054
m^{6}A 甲基转移酶 3 *METTL*3	2.01^{a}	1.29^{b}	1.00^{c}	0.111	<0.001
m^{6}A 甲基转移酶 14 *METTL*14	2.12^{a}	1.16^{b}	1.00^{b}	0.126	<0.001
甲硫氨酸腺苷高半胱氨酸酶 *Ahcy*	1.01	1.09	1.00	0.043	0.696
胱硫醚–β–合成酶 *CBS*	1.36^{a}	1.17^{ab}	1.00^{b}	0.059	0.035
5–甲基四氢叶酸–同型半胱氨酸	1.87^{a}	1.29^{b}	1.00^{c}	0.100	<0.001

甲基转移酶 *MTR*					
甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶 *BHMT*	1.25	1.06	1.00	0.068	0.332

3 讨 论

3.1 蛋氨酸缺乏对蛋鸡生产性能的影响

蛋氨酸是蛋鸡的第一限制性氨基酸，对蛋鸡的生产性能有重要的作用。研究表明，蛋氨酸含量较低时，提高蛋氨酸水平能够提高蛋鸡生产性能，当饲粮中蛋氨酸含量到一定水平时，继续添加蛋氨酸反而会降低生产性能[7-8]。本试验中，饲粮蛋氨酸均处于较低水平，0.33%蛋氨酸组蛋鸡的生产性能指标达到最高，但是料蛋比与0.27%蛋氨酸组无显著差异。Saki 等[8]的研究结果表明，蛋氨酸水平从 0.24%提高到 0.34%能显著提高蛋鸡的产蛋率、平均蛋重、平均日产蛋重和平均日采食量并降低料蛋比。Harms 等[9]的试验结果表明，饲粮蛋氨酸水平（0.20%~0.34%）对产蛋率、平均蛋重和平均日采食量有显著影响，当蛋氨酸水平高于 0.28%后对上述指标无显著影响。但 Keshavarz[10]的试验结果表明，54~72 周龄的白色单冠来航蛋鸡饲粮蛋氨酸水平从 0.36%降低到 0.23%会显著降低产蛋率、平均蛋重和饲料利用率，但是对平均日产蛋重和平均日采食量无显著影响。

3.2 饲粮蛋氨酸缺乏对蛋鸡血清游离氨基酸含量的影响

血清游离氨基酸的浓度在一定程度上可以反映动物体内氨基酸的代谢状况。由于氨基酸之间存在协同、替代、转换和拮抗的关系，饲粮中某种氨基酸的缺乏或过量均能造成氨基酸比例的失衡，影响自身或其他氨基酸的利用。本试验结果显示，饲粮蛋氨酸的水平会显著影响血清中一些氨基酸的含量和比例，如降低蛋氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸和精氨酸含量，提高丝氨酸和甘氨酸的含量。与本研究相似，吕明斌等[11]的试验结果也表明，饲粮蛋氨酸水平会影响丝氨酸、蛋氨酸和异亮氨酸的含量。Yodseranee 等[12]在肉鸡上的试验结果也表明饲粮蛋氨酸水平会影响血浆蛋氨酸、半胱氨酸和牛磺酸的含量。

3.3 饲粮蛋氨酸缺乏对蛋鸡肝脏蛋氨酸代谢过程的影响

动物摄入的蛋氨酸大约 20%在胃肠道进行消化代谢，80%经过血液运送至细胞和组织，

而一半以上的蛋氨酸在肝脏转化为 S–腺苷甲硫氨酸，进入蛋氨酸代谢途径[13]。蛋氨酸通过消耗 ATP 在甲硫氨酸腺苷转移酶的作用下转化为 S–腺苷甲硫氨酸，该酶主要由 *MAT*1*a* 编码[14]。90%以上的 S–腺苷甲硫氨酸随后可在甲基转移酶的作下转化为 S–腺苷同型半胱氨酸，该过程脱去的甲基可在甲基转移酶的作用，参与 DNA 和 RNA 的甲基化过程，从而调控基因的表达量及 RNA 介导的细胞通路[15-17]。本试验中蛋氨酸缺乏显著影响了 *Dnmt*1、*METTL*3 和 *METTL*14 的表达量，说明蛋氨酸缺乏可能影响 DNA 和 RNA 的甲基化过程。Mattocks 等[6]发现，短期蛋氨酸缺乏能够改善成年 C57BL/6J 小鼠 DNA 甲基化维持系统的效率，提高肝脏整体 DNA 甲基化水平。但是 Liu 等[18]的试验结果为，低蛋氨酸组和高蛋氨酸组 GC 富集的肌肉生长抑制素基因外显子 1 区域的甲基化水平分别为 46%和 83%，而且如果 GC 富集的区域已经高度甲基化时，饲粮蛋氨酸摄入过量或不足会导致去甲基化。RNA 的甲基化是 RNA 最常见和高丰度的修饰方式，由 S–腺苷甲硫氨酸提供甲基在碳或氮原子上形成 m^6A[19]。METTL3 是哺乳动物细胞中 m^6A 甲基转移酶复合体的活性成分，敲除 *METTL*3 基因可能通过 p53 介导的途径，引起 HeLa 细胞总 m^6A 水平会下降 30%以及 HepG2 细胞的凋亡[20]。METTL14 是另一种 m^6A 甲基转移酶复合体的活性成分，可以与 METTL3 蛋白以 1∶1 的化学计量比结合形成稳定二聚体复合物，调控细胞内 m^6A 在 mRNA 上的沉积[21]。目前关于蛋氨酸缺乏对 RNA 甲基化的影响还未见报道，本试验中蛋氨酸缺乏显著提高了 *METTL*3 和 *METTL*14 的表达量，说明蛋氨酸缺乏可能会影响 RNA 的甲基化水平，但是与蛋氨酸缺乏的剂量有关。

S–腺苷同型半胱氨酸在 Ahcy 的作用下分解为腺苷和高半胱氨酸，该过程是可逆的非限速步骤，其代谢通量由 S–腺苷同型半胱氨酸的合成及腺苷和高半胱氨酸消耗的速率决定而[22]。本试验中，3 个组的 *Ahcy* 表达量没有显著差异，说明蛋氨酸缺乏可能对上述代谢物的比例无影响。高半胱氨酸随后的代谢途径有 2 条：一个是在 MTR 的作用下利用 5–甲基–四氢叶酸和 BHMT 的作用下利用甜菜碱作为甲基供体甲基化再生成蛋氨酸，由此构成蛋氨酸的循环过程；另一个是在丝氨酸的参与下可被 CBS 催化发生转硫基作用形成胱硫醚，继而参与半胱氨酸、谷胱甘肽或牛磺酸合成和氧化降解等[23-24]。脱去甲基的四氢叶酸随后可经过循环过程重新生成 5–甲基–四氢叶酸，该过程同时将丝氨酸转化为甘氨酸。本试验中，蛋氨酸缺乏对 *MAT*1*a*、*CBS* 和 *MTR* 表达量有显著影响，说明蛋氨酸缺乏可能影响高半胱氨酸在代谢途径。同时，高剂量蛋氨酸缺乏组蛋鸡血清中半胱氨酸的含量的降低及丝氨酸和甘氨酸含量显著积累，说明蛋氨酸缺乏可能降低了蛋氨酸的转硫基作用，增强了再甲基化途径，且转硫基作用的降低程度可能大于再甲基化途径的增加。研究表明，当蛋氨酸缺乏时，高半胱

氨酸通过再甲基化生成蛋氨酸可保证甲基化反应的正常进行，尽管会降低 α–丁酮酸和谷胱甘肽的合成[25]。相反的，当蛋氨酸水平仅提高 10%，就会导致高半胱氨酸合成效率提高 2 倍[22]。蛋氨酸负载试验表明，蛋氨酸负载可活化大鼠肝细胞中同型半胱氨酸的转硫化途径，同时抑制其再甲基化途径，会显著减弱 BHMT 和蛋氨酸合成酶活性，但不影响 CBS 的活性[26]。但是，本试验中蛋氨酸缺乏也显著提高了 *CBS* 的表达量。Tang 等[27]研究表明，蛋氨酸剥夺会诱导组织通过 S–腺苷甲硫氨酸的独立机制下调 CBS 蛋白关闭转硫基途径，从而高效保留蛋氨酸；但是在 mRNA 水平上 *CBS* 表达量并没有降低，甚至有所提高，这与本研究的结果相一致。

4 结 论

① 蛋氨酸缺乏显著降低了海兰灰蛋鸡产蛋后期的产蛋率、平均日产蛋重和平均蛋重，提高了料蛋比。

② 蛋氨酸缺乏显著提高了肝脏中 *Dnmt*1、*METTL*3 和 *METTL*14 的表达量，影响 DNA 和 RNA 的甲基化过程。

③ 蛋氨酸缺乏显著降低了血清中蛋氨酸的含量，提高了血清中甘氨酸和丝氨酸的含量及肝脏中 *MTR* 的表达量，影响蛋氨酸的再合成和转硫基途径。

参考文献：

[1] AKBARI MOGHADDAM KAKHKI R,GOLIAN A,ZARGHI H.Effect of digestible methionine + cystine concentration on performance,egg quality and blood metabolites in laying hens[J].British Poultry Science,2016,57(3):403–414.

[2] BERTOLO R F,MCBREAIRTY L E.The nutritional burden of methylation reactions[J].Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care,2013,16(1):102–108.

[3] PERRONE C E,MALLOY V L,ORENTREICH D S,et al.Metabolic adaptations to methionine restriction that benefit health and lifespan in rodents[J].Experimental Gerontology,2013,48(7):654–660.

[4] KIKUSATO M,SUDO S,TOYOMIZU M.Methionine deficiency leads to hepatic fat accretion via impairment of fatty acid import by carnitine palmitoyltransferase Ⅰ[J].British Poultry Science,2015,56(2):225–231.

[5] JANKOWSKI J,KUBIŃSKA M,ZDUŃCZYK Z.Nutritional and immunomodulatory function of methionine in poultry diets–a review[J].Annals of Animal Science,2014,14(1):17–31.

[6] MATTOCKS D A L,MENTCH S J,SHNEYDER J,et al.Short term methionine restriction

increases hepatic global DNA methylation in adult but not young male C57BL/6J mice[J].Experimental Gerontology,2017,88:1–8.

[7] 梁中军,王瑛,韩雪娇,等.饲粮蛋氨酸水平对蛋鸡产蛋后期生产性能的影响[J].动物营养学报,2015,27(9):2699–2704.

[8] SAKI A A,NASERI HARSINI R,TABATABAEI M M,et al.Estimates of methionine and sulfur amino acid requirements for laying hens using different models[J].Revista Brasileira de Ciência Avícola,2012,14(3):209–216.

[9] HARMS R H,RUSSELL G B.Performance of commercial laying hens fed diets with various levels of methionine[J].The Journal of Applied Poultry Research,2003,12(4):449–455.

[10] KESHAVARZ K.Effects of reducing dietary protein,methionine,choline,folic acid,and vitamin B_{12} during the late stages of the egg production cycle on performance and eggshell quality[J].Poultry Science,2003,82(9):1407–1414.

[11] 吕明斌,孙作为,燕磊,等.肉仔鸡饲粮中蛋氨酸和半胱氨酸与赖氨酸适宜比例的研究[J].动物营养学报,2011,23(12):2109–2117.

[12] YODSERANEE R,BUNCHASAK C.Effects of dietary methionine source on productive performance,blood chemical,and hematological profiles in broiler chickens under tropical conditions[J].Tropical Animal Health and Production,2012,44(8):1957–1963.

[13] ROBINSON J L,MCBREAIRTY L E,RANDELL E W,et al.Restriction of dietary methyl donors limits methionine availability and affects the partitioning of dietary methionine for creatine and phosphatidylcholine synthesis in the neonatal piglet[J].The Journal of Nutritional Biochemistry,2016,35:81–86.

[14] MATO J M,LU S C.Role of S-adenosyl-*L*-methionine in liver health and injury[J].Hepatology,2007,45(5):1306–1312.

[15] WATERLAND R A.Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation[J].The Journal of Nutrition,2006,136(6S):1706S–1710S.

[16] JIA G F,FU Y,HE C.Reversible RNA adenosine methylation in biological regulation[J].Trends in Genetics,2013,29(2):108–115.

[17] FINKELSTEIN J D.The metabolism of homocysteine:pathways and regulation[J].European Journal of Pediatrics,1998,157（Suppl 2）:S40–S44.

[18] LIU G Q,ZONG K,ZHANG L L,et al.Dietary methionine affect meat qulity and myostatin gene

exon 1 region methylation in skeletal muscle tissues of broilers[J].Agricultural Sciences in China,2010,9(9):1338–1346.

[19] NIU Y M,ZHAO X,WU Y S,et al.N^6-methyl-adenosine (m^6A) in RNA:an old modification with a novel epigenetic function[J].Genomics,Proteomics & Bioinformatics,2013,11(1):8–17.

[20] FU Y,DOMINISSINI D,RECHAVI G,et al.Gene expression regulation mediated through reversible m^6A RNA methylation[J].Nature Reviews Genetics,2014,15(5):293–306.

[21] LIU J Z,YUE Y N,HAN D L,et al.A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N^6-adenosine methylation[J].Nature Chemical Biology,2014,10(2):93–95.

[22] MARTINOV M V,VITVITSKY V M,MOSHAROV E V,et al.A substrate switch:a new mode of regulation in the methionine metabolic pathway[J].Journal of Theoretical Biology,2000,204(4):521–532.

[23] BROSNAN J T,BROSNAN M E.The sulfur-containing amino acids:an overview[J].The Journal of Nutrition,2006,136(6):1636S–1640S.

[24] PILLAI P B,FANATICO A C,BEERS K W,et al.Homocysteine remethylation in young broilers fed varying levels of methionine,choline,and betaine[J].Poultry Science,2006,85(1):90–95.

[25] MATO J M,LU S C.The hepatocarcinogenic effect of methionine and choline deficient diets:an adaptation to the Warburg effect?[J].Alcoholism: Clinical and Experimental Research,2011,35(5):811–814.

[26] 高蔚娜,韩超,韦京豫,等.蛋氨酸负载对大鼠肝细胞 Hcy 代谢酶及相关代谢物的影响[J].营养学报,2013,35(6):545–548.

[27] TANG B Q,MUSTAFA A,GUPTA S,et al.Methionine-deficient diet induces post-transcriptional downregulation of cystathionine β-synthase[J].Nutrition,2010,26(11/12):1170–1175.

Effects of Methionine Deficiency on Performance, Serum Free Amino Acid Contents and Liver Methionine Metabolism Gene Expression of Laying Hens during Late Period of Laying

LIU Yilin[1]　WU Xin[2]　YIN Yulong[1,2]　WANG Zhanbin[1*]

(1. *Henan Provincial Academician Workstation of Feed Resource Development and Healthy Livestock*, *College of Animal Science and Technology*, *Henan University of Science and Technology*, *Luoyang* 471003, *China*; 2. *Hunan Provincial Engineering Research Center of Healthy Livestock*, *Key Laboratory of Agro-Ecological Processes in Subtropical Region*, *Institute*

of Subtropical Agriculture, *Chinese Academy of Sciences*, *Changsha* 410125, *China*)

Abstract: This experiment was conducted to study the effects of methionine deficiency on performance, serum free amino acid contents and liver methionine metabolism gene expression of laying hens during late period of laying. Based on the egg production, a total of 180 Hy-Line Grey laying hens at 62 weeks of age were allocated to 3 groups with 6 replicates each and 10 hens in each replicate. Hens in three groups were fed different diets which contained 0.21%, 0.27% and 0.33% (control group) methionine, respectively, and the experiment period was 90 days. The results showed as follows: 1) dietary methionine deficiency significantly reduced the average daily feed intake, laying rate, average daily egg production, average egg weight and unqualified rate of eggs ($P<0.05$), but significantly increased the ratio of feed to egg of laying hens ($P<0.05$). 2) Methionine deficiency significantly reduced the serum methionine content of laying hens ($P<0.05$). The contents of serum serine, glycine and alanine in 0.21% methionine group were significant higher than those in the other two groups ($P<0.05$). The contents of serum valine, isoleucine and arginine in 0.27% methionine group were significant lower than those in control group ($P<0.05$), and serum proline content in 0.27% methionine group was significant lower than that in 0.21% methionine group ($P<0.05$). 3) Compared with control group, the expression levels of DNA methyltransferase 1, N^6-adenosine-methyltransferase subunit 3 (*METTL3*) and N^6-adenosine-methyltransferase subunit 14 in liver of hens in 0.21% methionine group were significant improved ($P<0.05$), and the *METTL3* expression level in liver of hens in 0.27% methionine group was also significant improved ($P<0.05$). 4) Compared with control group, the expression levels of methionine adenosyltransferase 1a, cystathionine-beta-synthase and 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (*MTR*) in liver of hens in 0.21% methionine group were significant improved ($P<0.05$), and the *MTR* expression level in liver of hens in 0.27% methionine group was also significant improved ($P<0.05$). Methionine deficiency had no significant influence on the expression levels of adenosylhomocysteinas and betaine homocysteine methyltransferase in liver of hens ($P>0.05$). In conclusion, dietary methionine deficiency reduces performance of hens which may duo to the change of methionine metabolism pathway and the methylation of DNA and RNA.

Key word: methionine; laying hens; performance; methionine metabolism; methylation; gene expression

*Corresponding author, professor, E-mail:wangzhanbin3696@126.com （责任编辑　田艳明）